

## 眼房水の血管新生抑制作用の検討 - 糖尿病患者における作用低下とTGB2について

著者	早坂 恭子
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54951">http://hdl.handle.net/10097/54951</a>

①

1

博士論文

眼房水の血管新生抑制作用の検討－糖尿病  
における作用低下とTGF $\beta$ 2について

東北大学医学部第三内科

早坂 恭子

①

1

# 博士論文

眼房水の血管新生抑制作用の検討－糖尿病患者における作用低下とTGF $\beta$ 2について

東北大学医学部第三内科

早坂 恭子



## 1 ) 要 約

糖尿病性眼合併症である網膜症、血管新生緑内障の発症、進展において血管新生は主たる役割を果たす。我々が家兎眼組織各部の検討を行ったところ、眼房水に血管新生抑制作用のあることが判明している。そこで、眼房水中の血管新生抑制因子を同定すると共に、ヒトにおける眼房水的作用、糖尿病の影響について検討した。

血管新生抑制能はヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) の増殖と管腔形成の抑制能により判断した。ウシ眼房水は濃度依存性に H U V E C の増殖を抑制し、管腔形成も抑制した。ウシ眼房水を熱処理してもその H U V E C 増殖抑制活性に変化がなく、酸処理では活性が増加した。抗

t r a n s f o r m i n g   g r o w t h   f a c t o r

( T G F )  $\beta$  抗体の添加により、眼房水の H U V E C 増殖抑制活性、管腔形成抑制活性



は完全に中和された。ヘパリンセファロースカラムで分離を試みたところ、結合分画にHUVEC増殖抑制活性を認め、同分画と眼房水にはTGF $\beta$ 2が認められた。TGF $\beta$ 2は非結合分画には認められず、TGF $\beta$ 1はいずれにおいても認められなかった。以上のことから、眼房水の血管新生抑制作用の主たる因子はTGF $\beta$ 2であると考えられた。

ヒト眼房水もHUVEC増殖抑制活性をもっていたが、糖尿病患者由来眼房水ではこの活性が低下していた。眼房水中のTGF $\beta$ 2濃度に有意差は認められず、TGF $\beta$ 2活性化率が糖尿病患者由来のものでは有意に低下していた。TGF $\beta$ 2活性化の低下が糖尿病患者由来眼房水が血管内皮細胞増殖抑制活性の低い一つの原因であると考えられた。

## 2) 研究背景

糖尿病性眼合併症である網膜症、血管新生緑内障の発症、進展において血管新生は主たる役割を果たす。眼内の血管新生促進因子については、vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>1) - 3)</sup> や basic fibroblast growth factor (bFGF)<sup>4)</sup> など、多くの検討がなされてきた。一方、血管新生抑制因子についてもいくつかの報告がみられる<sup>5) 6)</sup>。我々が家兎眼組織各部の検討を行ったところ、眼房水に血管新生抑制作用のあることが判明しているが、その作用因子については不明であった<sup>7)</sup>。

### 3) 研究目的

眼房水中の血管新生抑制因子を同定すると共に、ヒトにおける眼房水の作用、糖尿病の影響について検討する。



#### 4 ) 研究 方 法

##### 1 ) 眼 房 水 の 採 取

屠殺牛眼（仙台ミートプラント・仙台）の角膜側を70%エタノールで洗浄した後、18ゲージ針をつけた注射器で穿刺し、前眼房水1ml強を採取した。宮田眼科病院・福島茂先生より、白内障、糖尿病性網膜症等の眼科手術の際に採取した前眼房水約100 $\mu$ lを提供していただいた（Table 1）。眼房水は-80 $^{\circ}$ Cで保存し、一部は凍結乾燥して-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

##### 2 ) 細 胞 培 養

細胞はヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた。新鮮ヒト臍帯は東北大学医学部付属病院産婦人科および仙台徳洲会病院産婦人科から提供していただいた。HUVECの分

離は山本らの方法<sup>8)</sup>に従った。脱血後、両端を無菌的に二重結紮したヒト臍帯を4℃の1%ペニシリン・ストレプトマイシン

(Sigma・USA)含有Eagle's

minimum essential medium

(MEM、ニッスイ・東京)培地内に保持し、

12時間以内にHUVECを分離した。ヒト臍帯を70%エタノールと滅菌

phosphate-buffered saline

(PBS)(-)で洗浄した後、臍帯静脈の一

端に14Frサクションチューブ(テルモ・

東京)を挿入固定し、他端を解放、同チューブに連結した注射器を用い静脈内腔も数

10mlの滅菌PBS(-)で洗浄した。その後、

解放端を再び二重結紮し、1mg/mlトリプシン(Sigma・USA)および

0.04mg/ml EDTA含有

PBS(-)10mlを臍帯静脈内に10分間ク

ランプした後、同液を1mlのウシ胎児血清



( F C S 、 三 光 純 薬 ・ 東 京 ) と 混 和 、  
1 5 0 0 r p m で 5 分 間 遠 心 し た 。 沈 殿 物 を  
M C D B 1 0 7 培 地 ( 極 東 製 薬 ・ 東 京 ) 1 0 m l  
に 混 和 、 1 5 0 0 r p m で 5 分 間 遠 心 し た 。 こ  
の 沈 殿 物 を 2 % F C S 、 2 5  $\mu$  g / m l  
e n d o t h e l i a l c e l l g r o w t h  
s u p p l e m e n t ( E C G S 、 B e c t o n  
D i c k i n s o n ・ U S A ) 、 1  $\mu$  g / m l イ ン  
ス リ ン ( S i g m a ・ U S A ) お よ び 1 0  $\mu$   
g / m l ヘ パ リ ン ( N o v o N o r d i s k ・  
D e n m a r k ) 含 有 M C D B 1 0 7 培 地 ( A 液 )  
3 m l に 溶 解 し 、 コ ラ ー ゲ ン コ ー ト 6 0 m m デ  
ィ ッ シ ュ ( 住 友 ベ ー ク ラ イ ト ・ 東 京 ) に 播 種  
し た 。 ト リ プ シ ン 液 の ク ラ ン プ 以 後 の 過 程 を  
6 ~ 7 回 く り 返 し 、 こ れ を 初 代 培 養 と し た 。  
H U V E C は 5 日 毎 に 0 . 2 5 % ト リ プ シ ン 含 有  
M E M 培 地 ( S i g m a ・ U S A ) 1 m l を 用 い  
て デ ィ ッ シ ュ よ り 分 離 、 1 0 % F C S 含 有  
M E M 培 地 1 0 m l に 混 和 、 1 5 0 0 r p m で 5

分間遠心した後、沈殿物をA液9 mlに溶解し、コラーゲンコート60 mmディッシュ3枚に播種することで1対3に継代培養した。以下の実験には第2から第5継代のHUVECを用いた。

### 3) HUVECの増殖能の検討

上記A液中に $0.5 \times 10^4 / \text{ml}$ に調整したHUVECを1 ml / well (24 well コラーゲンコートプレート、住友ベークライト・東京) ずつ播種後、第1、5日に眼房水が0 ~ 50 % (v / v) となるように調整したA液1 mlに交換し、第10日にコールターカウンター (Coulter・USA) により細胞数を計測した。この際、種々の処理を施した眼房水の作用や、眼房水と共に添加した抗TGF $\beta$ 中和抗体 (Genzyme・USA) の作用を検討した。また、リコンビナントTGF $\beta$  2 (Oncogene Science・



U S A ) の 作 用 も 検 討 し た 。

#### 4 ) H U V E C の 管 腔 形 成 能 の 検 討

H U V E C の 管 腔 形 成 は H a y a s h i ら の 方法<sup>9)</sup> に 従 っ た 。 タ イ プ I コ ラ ー ゲ ン 混 合 溶 液 ( C e l l m a t r i x T y p e I - A ( 新 田 ゼ ラ チ ン ・ 大 阪 ) 8 容 量 、 N a O H を 除 い た 1 0 倍 濃 度 M C D B 1 0 7 培 地 1 容 量 、 2 . 2 % N a H C O <sub>3</sub> お よ び 2 0 0 m M H E P E S 含 有 0 . 0 5 N N a O H 1 容 量 ) を 5 0 0  $\mu$  l / w e l l づ つ 1 2 w e l l プ レ ー ト ( 住 友 ベ ー ク ラ イ ト ・ 東 京 ) に 分 注 し 、 3 7  $^{\circ}$  C イ ン キ ュ ベ ー タ ー 内 に 3 0 分 間 静 置 し た 。 形 成 し た コ ラ ー ゲ ン ゲ ル 上 に 上 記 A 液 中 に  $1 . 0 \times 10^5$  / m l に 調 整 し た H U V E C を 2 m l / w e l l づ つ 播 種 し 、 2 4 時 間 後 に コ ラ ー ゲ ン 混 合 溶 液 2 5 0  $\mu$  l / w e l l を サ ブ コ ン フ ル エ ン ト と な っ た H U V E C の 単 層 培 養 上 に 重 層 し た 。 こ れ を 眼 房 水 が 0 あ る い は 4 0 %

(v/v) となるように調整した A 液で培養した。48 時間後に  $\times 40$  倍の光学顕微鏡で写真撮影し、網目構造の密疎から管腔形成の多寡を判定した。眼房水と共に添加した抗 TGF $\beta$  中和抗体  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  の作用も検討した。

光学顕微鏡にて観察後、一部は次の方法により電子顕微鏡的観察を行った。まず、コーゲンゲルごと 2.5% グルタルアルデヒド前固定し、2% 四酸化オスミウムにて後固定、50 ~ 100% エタノール系列にて順次脱水した後、エポン樹脂に包埋した。80 ~ 90 nm の超薄切片を作成した後、鉛・ウラン二重染色し、透過型電子顕微鏡にて観察した。

#### 5) 眼房水の熱処理、酸処理

眼房水を煮沸 ( $100^\circ$  で 10 分) 処理した。また、眼房水  $1 \text{ ml}$  に氷酢酸  $30 \mu\text{l}$  を添加した (pH 1.8) 後、凍結乾燥し PBS (-) で



溶解して使用した。これを未処理の眼房水と同様、H U V E C 増殖能の実験に用いて影響を検討した。

#### 6) ヘパリンセファロースカラムによる分離

ヘパリンセファロース CL-6B (Pharmacia・Sweden) を充填、あらかじめランニングバッファー (0.15 M NaCl および 0.05% NaN<sub>3</sub> 含有 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.3)) で平衡化したカラムシステム (Pharmacia・Sweden) に眼房水 10 ml を添加した。それに続き、ランニングバッファーを流速 0.2 ml / 分、5 ml / 本、吸光度 (波長 280) モニター感度 0.5 で流した。流出液の吸光度モニター波形をみながら 40 ~ 50 本の流出液を回収するまで、バッファーを流した (非結合分画)。次に、吸光度モニター

感度を 0.05 として波形をみながら、抽出バッファー (1.5 M NaCl および 0.05 %  $\text{NaN}_3$  含有 0.01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.3)) を流速 0.6 ml / 分で 1 時間流した後、同速でランニングバッファーを 400 ml 流した。これも 5 ml / 本でガラス管に回収した (結合分画)。両分画毎に、吸光度波形に従い分離物が含まれると考えられるフラクションを集め (Fig. 1)、その液量をメスシリンダーで測定した。各分画を、分子量 1 万で分離の特性をもった濾過膜 (Micro-ProDiCon Membrane、Spectrum・USA) を用いた減圧限外濾過システム (Spectrum・USA) にかけて、濃縮した。濃縮物の液量を微量メスシリンダーで測定し、濃縮率 (v / v) を計算した。H U V E C 増殖能の実験に用いる際には、この濃縮率に従い添加した。



7) TGF $\beta$  の測定

TGF $\beta$  1 は Genzyme 社 (USA) の、  
TGF $\beta$  2 は Amersham 社 (UK) の、  
ELISA kit を用いて測定した。

TGF $\beta$  1 の測定に先立ち、これを活性化  
するため、眼房水 10  $\mu$ l をサンプルバッ  
ファー 450  $\mu$ l で希釈した後、1N HCl 20  
 $\mu$ l を添加し、4 $^{\circ}$ C 下に 1 時間静置した。こ  
れに、1N NaOH 20  $\mu$ l を加え中和した  
ものを測定に用いた。用意したサンプル  
100  $\mu$ l を mouse monoclonal  
anti-human TGF $\beta$  1 が固相化された  
96 穴プレートに移し、37 $^{\circ}$ C 下に 1 時間静  
置した。洗浄バッファー 400  $\mu$ l で 5 回洗浄  
後、polyclonal anti-TGF $\beta$  1 /  
horseradish peroxidase  
(HRP) conjugate 100  $\mu$ l を添加し、  
37 $^{\circ}$ C 下に 1 時間静置した。洗浄バッファー  
400  $\mu$ l で 5 回洗浄後、2%

t e t r a m e t h y l b e n z i d i n e ( T M B )  
/ 0 . 0 3 %  $H_2O_2$  1 0 0  $\mu$  l を添加し、室  
温で20分間静置した。2 N の混合酸 1 0 0  $\mu$   
l を添加し、波長 4 5 0 n m で吸光度測定した。  
T G F  $\beta$  1 スタンダードを用いたカーブより、  
吸光度から T G F  $\beta$  1 濃度を求めた。

T G F  $\beta$  2 の測定においても、これを活性化  
するため、眼房水 5 0  $\mu$  l をサンプルバッ  
ファー 4 1 0  $\mu$  l で希釈した後、1 N H C l  
2 0  $\mu$  l を添加し、4  $^{\circ}$  C 下に1時間静置した。  
これに、1 N N a O H 2 0  $\mu$  l を加え中和し  
たものを測定に用いた。また、眼房水の一部  
は、活性化して存在する T G F  $\beta$  2 濃度を知  
るため、眼房水 1 0 0  $\mu$  l をサンプルバッ  
ファー 1 0 0  $\mu$  l で希釈したのみで、酸処理の  
過程を省いて測定に用いた。用意したサンプ  
ル 2 0 0  $\mu$  l と希釈液 5 0  $\mu$  l を m u r i n e  
m o n o c l o n a l a n t i - h u m a n T G F  $\beta$   
2 が固相化された96穴プレートに移し、室



温で2時間静置した。洗浄バッファー400  $\mu$ lで3回洗浄後、polyclonal anti-TGF $\beta$ 2 / HRP conjugate 200  $\mu$ lを添加し、室温で2時間静置した。洗浄バッファー400  $\mu$ lで5回洗浄後、TMB / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>液 200  $\mu$ lを添加し、室温で20分間静置した。1N硫酸50  $\mu$ lを添加し、波長450nmで吸光度測定した。TGF $\beta$ 2スタンダードを用いたカーブより、吸光度からTGF $\beta$ 2濃度を求めた。

#### 8) 統計学的解析

結果はduplicateで行われた実験から計算したmean  $\pm$  SEで示した。統計学的解析は対応のないt検定でおこなった。

#### 5) 実験結果

##### 1) ウシ眼房水のHUVEC増殖抑制およ

## び管腔形成抑制作用

ウシ眼房水は濃度依存性にHUVECの増殖を抑制した。Fig. 2に示すように、眼房水非添加群では細胞数は $0.5 \times 10^4$  / well から  $15.5 \pm 1.95 \times 10^4$  / well まで増加したが、ウシ眼房水5%添加群では  $11.8 \pm 2.35 \times 10^4$  / well、10%添加群では  $9.78 \pm 1.43 \times 10^4$  / well、20%添加群では  $4.70 \pm 0.34 \times 10^4$  / well、50%添加群では  $1.00 \pm 0.22 \times 10^4$  / well と、10%以上の眼房水添加では増殖が有意に抑制された。眼房水非添加群ではPBS(-)を200  $\mu$ l 添加し、ウシ眼房水添加群ではそれぞれの濃度に一致した眼房水量を添加した上、PBS(-)で両者の和が200  $\mu$ l となるよう補正した。50%添加群では凍結乾燥された眼房水をPBS(-)で元の4倍濃度に調整した液125  $\mu$ l とPBS(-)75  $\mu$ l を添加した。



ウシ眼房水はまた、Fig. 2 に示すように H U V E C の管腔形成をも抑制した。Fig. 3 の網目構造が管腔形成を表すことを証明するため、電子顕微鏡でこれを確認した ( Fig. 4 ) 。

## 2 ) ウシ眼房水の熱処理、酸処理が

### H U V E C 増殖抑制に与える影響

ウシ眼房水とウシ眼房水を  $100^{\circ}\text{C}$  で 10 分煮沸処理したものをそれぞれ 20 % 添加して、H U V E C の増殖に対する影響を検討した。眼房水非添加群を 100 % としたの Growth Index は、未処理眼房水添加群で  $64.4 \pm 4.4\%$  に対して熱処理眼房水添加群では  $63.7 \pm 9.4\%$  と両群間に差が無かった ( Table 2 ) 。

また、ウシ眼房水とウシ眼房水を 3 % 酢酸処理したものをそれぞれ 20 % 添加して、H U V E C の増殖に対する影響を検討した。

未処理眼房水添加群での Growth

Index が  $57.7 \pm 5.3\%$  であったのに対して、酸処理眼房水添加群では  $32.6 \pm 7.1\%$  と有意に低値だった (Table 3)。

### 3) 抗 TGF $\beta$ 中和抗体がウシ眼房水の HUVEC 増殖抑制および管腔形成抑制作用に与える影響

抗 TGF $\beta$  抗体はウシ眼房水の HUVEC 増殖抑制作用を濃度依存性に中和した。眼房水非添加群では細胞数は  $7.84 \pm 0.90 \times 10^4$  / well まで増加したが、ウシ眼房水 20% 添加群では  $3.19 \pm 0.58 \times 10^4$  / well と増殖が有意に抑制され、これに抗 TGF $\beta$  抗体を 1.5、15、150  $\mu\text{g/ml}$  と添加することにより、それぞれ  $6.18 \pm 0.45 \times 10^4$  / well、 $7.19 \pm 0.66 \times 10^4$  / well、 $7.31 \pm 0.76 \times 10^4$  / well と、ウシ眼房水の作用は中和された。



( F i g . 5 ) 。

また、抗 T G F  $\beta$  抗体  $100 \mu\text{g} / \text{ml}$  をウシ眼房水  $40\%$  と共に添加することにより、眼房水の H U V E C 管腔形成抑制が中和された ( F i g . 6 ) 。

4 ) ウシ眼房水のヘパリンセファロースカラム分離各分画が H U V E C 増殖抑制に与える影響

ウシ眼房水  $10 \text{ ml}$  をヘパリンセファロースカラムに展開したところ、非結合・結合分画はそれぞれ F i g . 1 のように流出した。非結合分画ではフラクション  $5 \sim 24$  を、結合分画ではフラクション  $21 \sim 41$  を回収し、濃縮した。カラム処理前の眼房水に換算して H U V E C 培養液中に  $20\%$  になる量を添加したところ、眼房水非添加群では細胞数は  $7.55 \pm 0.34 \times 10^4 / \text{well}$  まで増加し、ウシ眼房水  $20\%$  添加群では  $3.25 \pm 0.73$

$\times 10^4 / \text{well}$ 、結合分画添加群では  
 $5.06 \pm 0.50 \times 10^4 / \text{well}$ と増殖が有意  
 に抑制されたのに対して、非結合分画添加群  
 では  $7.28 \pm 0.52 \times 10^4 / \text{well}$ と眼房水  
 非添加群と差がなかった (Fig. 7)。

#### 5) ウシ眼房水中の TGF $\beta$ の測定

ウシ眼房水中には  $5.68 \pm 1.19 \text{ ng/ml}$ 、  
 ウシ眼房水のヘパリンセファロース結合分画  
 には  $1.39 \pm 0.38 \text{ ng/ml}$ の TGF $\beta$  2を検  
 出した。一方、ヘパリンセファロース非結合  
 分画にはほとんど検出することができなかつ  
 た。なお、TGF $\beta$  1はいずれの検体におい  
 ても  $0.1 \text{ ng/ml}$ の検出限界内では検出で  
 きなかった (Table 4)。

#### 6) ヒト眼房水の HUVEC 増殖抑制作用 と糖尿病の影響

眼房水提供患者の臨床背景は Table 1



に示す通りであった。白内障の手術を受けた者が多くを占めたが、糖尿病群では黄斑症や硝子体出血に対する手術を受けた者も1/3程度いた。また、糖尿病性網膜症は単純型以下の者が多くを占めた。

眼房水を糖尿病・非糖尿病両群10眼ずつ混和し、1回のHUVEC増殖抑制実験に用いた。眼房水非添加群では細胞数は $14.7 \pm 0.81 \times 10^4 / \text{well}$ まで増加したのに対し、ヒト非糖尿病者由来眼房水20%添加群では $6.10 \pm 0.72 \times 10^4 / \text{well}$ 、糖尿病患者由来眼房水添加群でも $9.35 \pm 0.85 \times 10^4 / \text{well}$ と有意に増殖が抑制された。ただし、糖尿病患者由来眼房水添加群は非糖尿病者群に比べて有意にHUVEC増殖抑制能が低下していた(Fig. 8)。

#### 7) ヒト眼房水中のTGF $\beta$ の測定

糖尿病・非糖尿病両群17眼ずつをTGF

$\beta 1$  および  $\beta 2$  の測定に、20眼ずつを2眼ずつ混和して全および活性型 TGF  $\beta 2$  の測定に用いた。

非糖尿病患者眼房水中の TGF  $\beta 2$  濃度は  $7.03 \pm 0.75 \text{ ng/ml}$  であったのに対して、糖尿病患者眼房水中の濃度は  $6.40 \pm 0.72 \text{ ng/ml}$  であり、有意差を認めなかった。一方、TGF  $\beta 1$  はいずれにおいても  $0.1 \text{ ng/ml}$  の検出限界内では検出できなかった (Table 5)。

活性型 TGF  $\beta 2$  濃度を測定し、眼房水中の TGF  $\beta 2$  活性化率を求めると、非糖尿病患者眼房水では  $12.4 \pm 1.20\%$  であったのに対して、糖尿病患者眼房水では  $7.70 \pm 0.72\%$  と有意に低下していた (Table 6)。

#### 8) リコンビナント TGF $\beta 2$ の HUVEC 増殖抑制作用



糖尿病者由来眼房水20%添加時の活性型TGF $\beta$ 2濃度に匹敵する180 pg/mlの活性型リコンビナントTGF $\beta$ 2を添加し、HUVEC増殖能への影響を検討した。4回の実験により、眼房水非添加群では細胞数は $14.2 \pm 1.05 \times 10^4$  / wellまで増加したのに対し、TGF $\beta$ 2 180 pg/ml添加群では $6.45 \pm 0.92 \times 10^4$  / wellと有意( $p < 0.005$ )に増殖が抑制された。糖尿病者由来眼房水20%添加および活性型リコンビナントTGF $\beta$ 2 180 pg/ml添加により、HUVECの増殖は共に約40%に抑制された。

## 6) 考察

in vivoにおけるchorioallantoic membrane assay<sup>10)</sup>などによる血管新生能の直接の

確認に対して、*in vitro*では血管内皮細胞の増殖能や管腔形成能からこれを推察することが広くおこなわれている<sup>9) 11)</sup>。

また、HUVECなどの大血管由来内皮細胞と網膜内皮細胞などの微小血管由来のものでは、プロスタグランジンやプラスミノゲンアクチベーターの分泌能<sup>12)</sup>、VEGFに対する反応性<sup>13)</sup>、高グルコースに対する反応性<sup>14)</sup>などに差があることが知られているが、*in vitro*での血管新生能の検討についてはHUVECなどを用いて行われることも多く<sup>9) 11)</sup>、本研究でもこれを用いて検討した。

ウシ眼房水の添加によりHUVECの増殖能や管腔形成能は抑制され、ウシ眼房水も家兔眼房水と同様に血管新生抑制作用をもつと考えられた。

ウシ眼房水を熱処理してもそのHUVEC増殖抑制活性に変化がなく、酸処理では活性が増加したことから、HUVEC増殖抑制活



性の主たる因子はTGF $\beta$ であることが予想された。そこで、抗TGF $\beta$ 抗体をウシ眼房水と共に添加すると、眼房水のHUVEC増殖抑制活性、管腔形成抑制活性は完全に中和された。

一方、これと並行して、DEAEセファロースカラムなどによる血管内皮細胞増殖抑制因子の分離を試みたが、有意な活性を保持できたのはヘパリンセファロースカラムにて分離した結合分画のみであった。TGF $\beta$ とヘパリンセファロースの親和性については報告されており<sup>15)</sup>、実際に眼房水およびヘパリンセファロース結合・非結合分画中のTGF $\beta$ 濃度を測定した。

TGF $\beta$  1、 $\beta$  2のそれぞれをヒトTGF $\beta$  1、 $\beta$  2測定用ELISAキットを用いて測定した。ウシとヒトではTGF $\beta$  1、 $\beta$  2ともに100%ホモロジーがあることが知られており<sup>16)</sup>、同キットを用いることは問題ない

と判断した。TGF $\beta$  2はウシ眼房水およびそのヘパリンセファロース結合分画には認められたが、非結合分画には認められなかった。一方、TGF $\beta$  1はいずれにおいても認められなかった。

ところで、哺乳類ではTGF $\beta$  1～3が存在することが知られており、本研究で使った中和抗体もTGF $\beta$  1～3に対することが報告されている。また、TGF $\beta$ の作用発現にはtype Iとtype IIのTGF $\beta$ レセプターのヘテロダイマーの複合体形成が必要であるが、両レセプターとのリガンド親和性はTGF $\beta$  1 >  $\beta$  3 >  $\beta$  2であり<sup>17)</sup>、TGF $\beta$  2は $\beta$  3に比べ作用が弱いと予想される。以上のことから、TGF $\beta$  3についても検討が必要であったが、ELISA・RIA等の適当な測定系がなく行い得なかった。

しかし、非糖尿病者眼房水20%添加に匹敵する活性型リコンビナントTGF $\beta$  2



180 pg/ml の添加にても同等の HUVEC 増殖抑制作用が得られたことから、眼房水中に存在する TGF $\beta$  が  $\beta$ 2 のみであっても作用の説明は可能と考えられた。また、前眼部に対する免疫染色の報告では、TGF $\beta$ 3 はほとんど存在しないとされている<sup>18)</sup>。これらのことから、眼房水の血管新生抑制作用に TGF $\beta$ 3 が関与している可能性は高くはないと考えられた。

以上のことから、眼房水の血管新生抑制作用の主たる因子は TGF $\beta$ 2 であると考えられた。

なお、D'Amore ら<sup>19)</sup>、Yoshimura ら<sup>20)</sup> は TGF $\beta$  に対する反応性は大血管由来内皮細胞と微小血管由来内皮細胞で同様であったと報告しており、今回の検討は大血管由来内皮細胞である HUVEC を用いて行われたが、検討の結果は血管新生の主体である微小血管内皮細胞に

も当てはまるものと考えられた。

次に、ヒト眼房水のHUVEC増殖抑制作用を検討すると、糖尿病患者由来の眼房水ではこの活性が低下していることが明らかとなった。しかし、眼房水中のTGF $\beta$ 2濃度は糖尿病患者由来のもので若干低値であるものの、有意な差はみられなかった。そこで、眼房水中のTGF $\beta$ 2活性化率を求めると、糖尿病患者由来のものでは有意に低下しており、このTGF $\beta$ 2活性化の低下が糖尿病患者由来眼房水が血管内皮細胞増殖抑制活性の低い一つの原因であると考えられた。

なお、HUVEC増殖能の検討の際に行った活性化（30%酢酸処理）とTGF $\beta$ 測定に際して行った活性化（4%塩酸処理）はそれぞれのプロトコールによって行ったために異なるが、pHは1.8と1.6とそれぞれにTGF $\beta$ を完全に活性化するのに十分なものであり、TGF $\beta$ 2活性化率の計算等には問



題はないものと判断した。

TGF $\beta$ については、生理的状态では血管新生抑制に働くものの、病的状态では血管新生刺激に働くとの考えもある。したがって、本研究においても、糖尿病の有無のみならず、その網膜症の程度との細かい検討が望ましかった。しかし、眼房水の容量が僅少であるため、HUVEC増殖抑制能・TGF $\beta$ 2活性化率の検討には数眼の混合液が必要であった。また、前増殖性および増殖性網膜症を有する眼からの検体は糖尿病患者由来眼房水の約2割で、検体の活性を保持する観点から長期保存も困難であり、網膜症の程度別の混合液の作成もできなかった。この点については、測定系の変更・調整を含めて、今後の検討課題であると考えている。

ところで、眼内のTGFファミリーについては、水晶体周囲の間葉系細胞の遊走能<sup>21)</sup>や、網膜色素上皮細胞の形態変化<sup>22)</sup>や

H L A - D R の 発 現 <sup>2 3 )</sup>、 貪 色 能 <sup>2 4 )</sup> を 調 整 する こと などが 報 告 さ れ て い る 。 特 に、 T G F  $\beta$  2 に つ い て は、 網 膜 光 凝 固 療 法 の 後、 網 膜 色素 上 皮 細 胞 に お け る 産 生 が 亢 進 する <sup>2 0 ) 2 5 )</sup> と 共 に、 硝 子 体 お よ び 眼 房 水 内 で の 濃 度 が 上 昇 する こと などが 報 告 さ れ て い る <sup>2 6 )</sup>。 今 回 の 検 討 に よ っ て 明 ら か と な っ た 眼 房 水 の T G F  $\beta$  2 に よ る 血 管 新 生 抑 制 作 用 は、 直 接 的 に は 血 管 新 生 緑 内 障 の 予 防 の 役 割 を 果た す と 共 に、 硝 子 体 や 網 膜 で の T G F  $\beta$  2 濃 度 や 血 管 新 生 抑 制 活 性 の 反 映 で も あ る と 考 え ら れ た。 糖 尿 病 者 で は 眼 房 水 の み に と ど ま ら ず、 後 眼 部 に お い て も 血 管 新 生 抑 制 活 性 が 低下 し て い る こ と が 予 想 さ れ、 こ の こ と が 糖 尿 病 性 網 膜 症 の 発 症、 進 展 に お い て 影 響 を 与 え て い る こ と が 考 え ら れ た。

## 7 ) 結 論



眼房水は主にTGF $\beta$ 2により血管新生抑制作用をもつことが明らかとなった。糖尿病患者由来の眼房水ではこの活性が低下しているが、これは眼房水中のTGF $\beta$ 2活性化の低下が一つの原因であると考えられた。

## ( 文 献 )

- 1 . L e u n g   D W ,   C a c h i a n e s   G ,  
K u a n g   W J ,   G o e d d e l   D V ,  
F e r r a r a   N :   V a s c u l a r  
e n d o t h e l i a l   g r o w t h   f a c t o r  
i s   s e c r e t e d   a n g i o g e n i c  
m i t o g e n .   S c i e n c e   2 4 6 :   1 3 0 6  
- 1 3 0 9 ,   1 9 8 9
- 2 . S c w e i k i   D ,   I t i n   A ,  
S o f f e r   D ,   K e s h e t   E :  
V a s c u l a r   e n d o t h e l i a l  
g r o w t h   f a c t o r   i n d u c e d   b y  
h y p o x i a   m a y   m e d i a t e  
h y p o x i a - i n i t i a t e  
a n g i o g e n e s i s .   N a t u r e   3 5 9 :  
8 4 3 - 8 4 5 ,   1 9 9 2
- 3 . A i e l l o   L P ,   N o r t h r u p   J M ,  
K e y t   B A ,   T a k a g i   H ,   I w a m o t o  
M :   A   h y p o x i c   r e g u l a t i o n   o f



vascular endothelial growth  
factor in retinal cells.

Arch. Ophthalmol. 113:

1538 - 1544, 1995

4. Kimura H, Sakamoto T,  
Hinton DR, Spee C, Ogura Y,  
Tabata Y, Ikeda Y, Ryan SJ:

A new model of subretinal  
neovascularization in the  
rabbit. Invest. Ophthalmol.

Vis. Sci. 36: 2110 - 2119,  
1995

5. Raymond L, Jacobson B:  
Isolation and

identification of  
stimulatory and inhibitory  
cell growth factors in

bovine vitreous. Exp. Eye.

Res. 34: 267 - 286, 1982

- 6 . J a c o b s o n B , D o r f m a n T ,  
B a s o P K , H a s a n y S M :  
I n h i b i t i o n o f v a s c u l a r  
e n d o t h e l i a l c e l l g r o w t h a n d  
t r y p s i n a c t i v i t y b y  
v i t r e o u s . E x p . E y e . R e s . 4 1 :  
5 8 1 - 5 9 5 , 1 9 8 5
- 7 . O k a m o t o T , O i k a w a S ,  
T o y o t a T : A b s e n c e o f  
a n g i o g e n e s i s - i n h i b i t o r y  
a c t i v i t y i n a q u e o u s h u m o r  
o f d i a b e t i c r a b b i t s .  
D i a b e t e s 3 9 : 1 2 - 1 6 , 1 9 9 0
- 8 . 山 本 清 高 : 血 管 内 皮 細 胞 の 純 培 養 . 細  
胞 2 0 : 3 2 9 - 3 3 3 , 1 9 8 8
- 9 . H a y a s h i J N , I t o H ,  
K a n a y a s u T , A s u w a N ,  
M o r i t a I , I s h i i T , M u r o t a S :  
E f f e c t o f g l u c o s e o n



m i g r a t i o n , p r o l i f e r a t i o n  
a n d t u b e f o r m a t i o n b y  
v a s c u l a r e n d o t h e l i a l c e l l s .

V i r c h o w s A r c h i v . B . C e l l  
P a t h o l . 6 0 : 2 4 5 - 2 5 2 , 1 9 9 1  
1 0 . O k a m o t o T , O i k a w a S ,  
T o y o t a T , G o t o Y :

A n g i o g e n e s i s f a c t o r s i n  
o c u l a r t i s s u e s o f n o r m a l  
r a b b i t s o n c h o r i o a l l a n t o i c  
m e m b r a n e a s s a y . T o h o k u

J . E x p . M e d . 1 5 4 : 6 3 - 7 0 , 1 9 8 8

1 1 . T e z u k a M , K o y a m a N ,  
M o r i s a k i N , S a i t o u Y ,  
Y o s h i d a S , A r a k i N ,

H o r i u c h i S : A n g i o g e n i c  
e f f e c t s o f a d v a n c e d

g l y c a t u i n e n d p r o d u c t s o f  
t h e m a i l l a r d r e a c t i o n o n

cultured human umbilical  
cord vein endothelial  
cells. Biochem. Biophys.

Res. Comm. 193: 674 - 680,

1993

12. Rymaszewski Z,

Szymanski PT, Abplanalp

WA, Myatt L, Di Salvo J,

Cohen RM: Human retinal

vascular cells differ from

umbilical cells in

synthetic functions and

their response to glucose.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 199:

183 - 191, 1992

13. Thieme H, Aiello LP,

Takagi H, Ferrara N, King

GL: Comparative analysis of

vascular endothelial growth



factor receptors on retinal  
and aortic vascular  
endothelial cells. Diabetes  
44: 98 - 103, 1995

14. Olgemoller B,  
Schleicher ED, Gerbitz KD:  
Differential kinetics of  
glucose metabolism in  
porcine retinal and aortic  
endothelial cells.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
28: 15 - 17, 1990

15. Besner GE, Klagsbrun M:  
Macrophages secrete a  
heparin-binding inhibitor  
of endothelial cell growth.

Microvasc. Res. 42: 187 -  
197, 1991

16. Dasch JR, Pace DR,

Weagell W, Inenaga D,  
Ellingsworth L: Monoclonal  
antibodies recognizing  
transforming growth  
factor-beta. Bioactivity  
neutralization and  
transforming growth factor  
beta 2 affinity  
purification. Immunol. 142:  
1536-1541, 1989

17. 一篠秀憲: TGF $\beta$ リセプターの構造  
と機能. 実験医学 10: 1845-1852,  
1992

18. Pasquale LR, Dorman-  
Pease ME, Luttly GA, Quigley  
HA, Jampel HD:

Immunologicalization of  
TGF-beta 1, TGF-beta 2, and  
TGF-beta 3 in the anterior



segment of the human eye.

Invest. Ophthalmol. Vis. Science  
34: 23 - 30, 1993

19. D'Amore PA, Smith SR:  
Growth factor effects on  
cells of the vascular wall:  
a survey. Growth Factor 81:  
61 - 75, 1993

20. Yoshimura N, Matsumoto  
M, Shimizu H, Mandai M,  
Hata Y, Ishibashi T:  
Photocoagulated human  
retinal pigment epithelial  
cells produce an inhibitor  
of vascular endothelial  
cell proliferation.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.  
36: 1686 - 1691, 1995

21. Reneker LW, Silversides

DW, Patel K, Overbeek PA:

TGF alpha can act as a

chemoattractant to

pericytic mesenchymal

cells in developing mouse

eyes. Development 121:

1669-1680, 1995

22. Ando H, Kodama R,

Tomoda Y, Eguchi G:

Transforming growth

factor-beta 1 induces

morphological changes

accompanied by

extracellular matrix

reconstitution in cultures

of avian retinal pigmented

epithelial cells. Jpn. J.

Ophthalmol. 39: 1-11, 1995

23. Gabrielian K, Osusky R,



Sippy BD, Ryan SJ, Hinton DR: Effect of TGF-beta on interferon-gamma induced HLA-DR expression in human retinal pigment epithelial cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35: 4253-4259, 1994

24. Sheu SJ, Sakamoto T, Osusky R, Wang HM, Ogden TE, Ryan SJ, Hinton DR, Gopalakrishna R: Transforming growth factor-beta regulates human retinal epithelial cell phagocytosis by influencing a protein kinase C-dependent pathway. Graefes. Arch. Clin.

Exp.Ophthalmol. 232: 695 -  
701, 1994

25. Matsumoto M, Yoshimura  
N, Honda Y: Increased  
production of transforming  
growth factor-beta 2 from  
cultured human retinal  
pigment epithelial cells by  
photocoagulation. Invest.  
Ophthalmol.Vis.Sci. 35:  
4245 - 4252, 1994

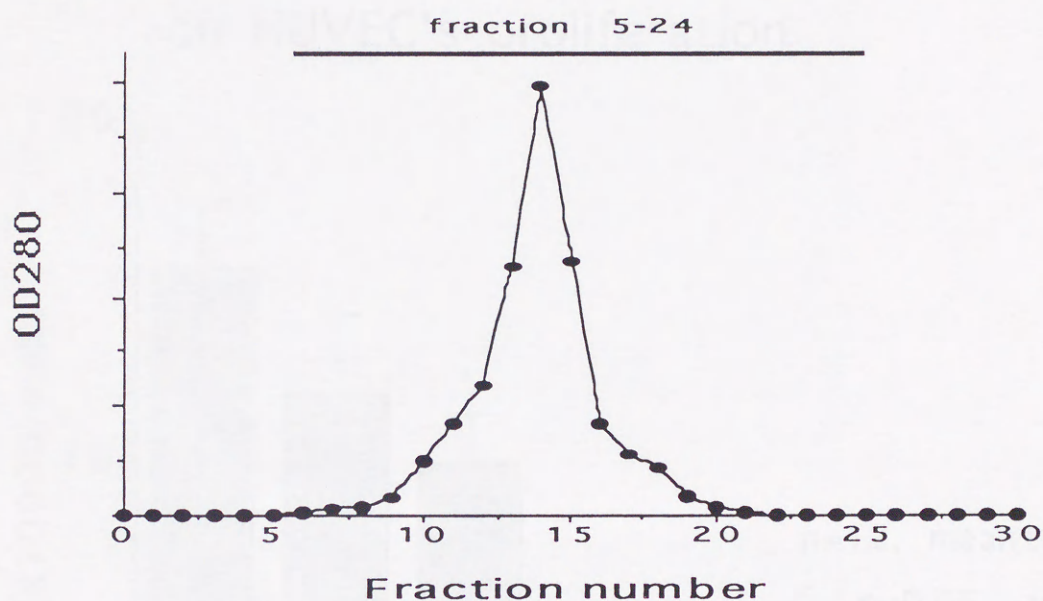
26. Ie D, Gordon LW, Glaser  
BM, Pena RA: Transforming  
growth factor-beta 2 levels  
increase following retinal  
laser photocoagulation.  
Curr.Eye.Res. 13: 743 - 746,  
1994



Fig. 1

Flow curve of aqueous humor  
from heparin sepharose column

1. Unbound fraction



2. Bound fraction

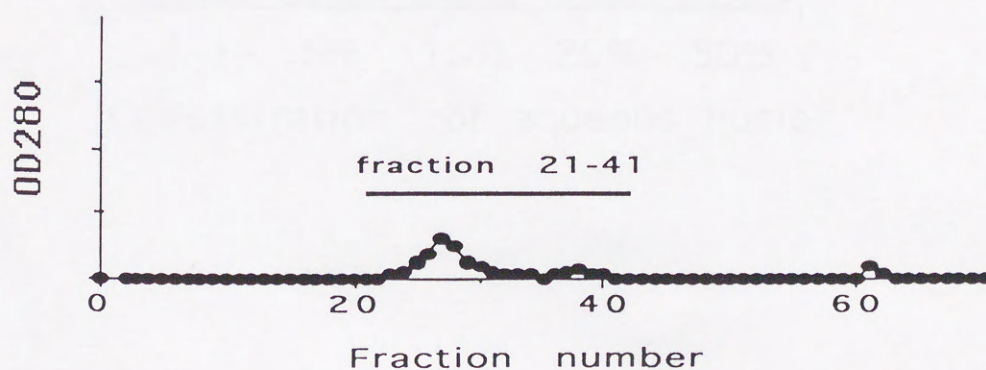
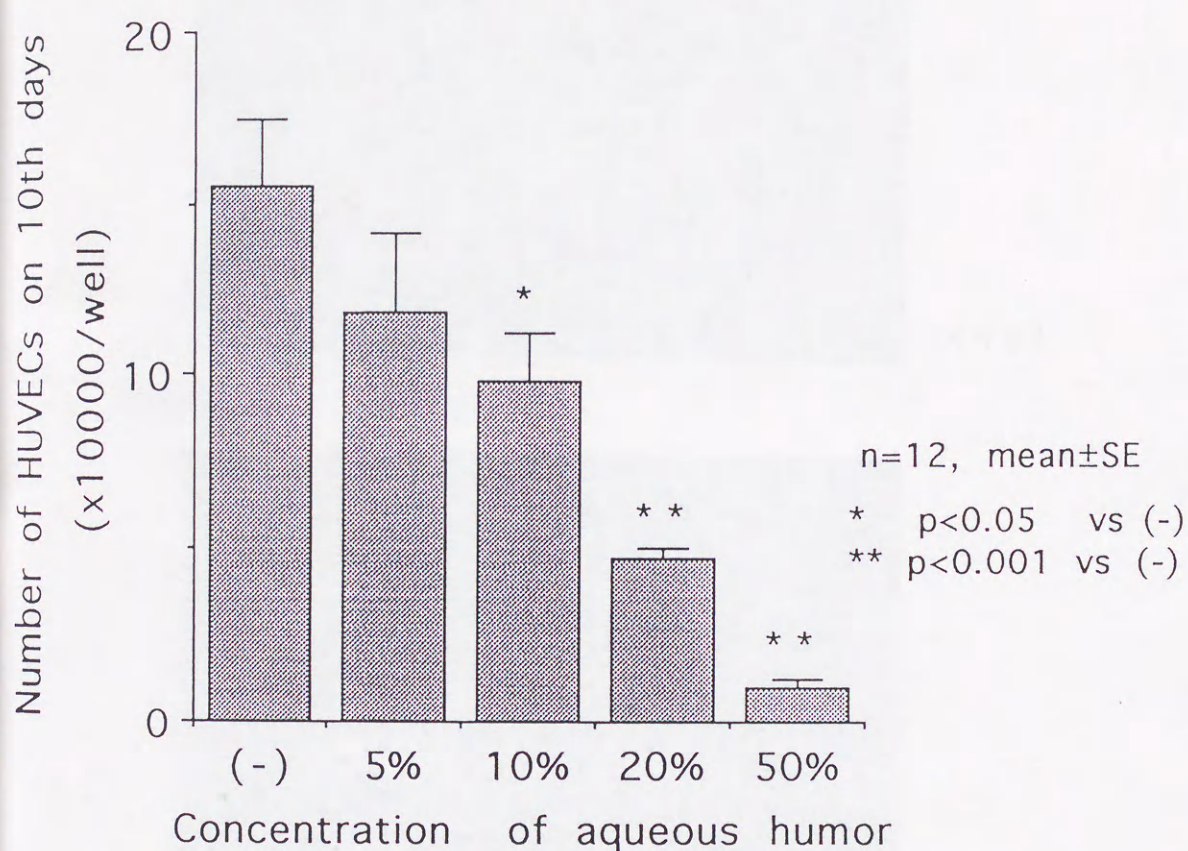


Fig.2

Effect of bovine aqueous humor  
on HUVEC's proliferation

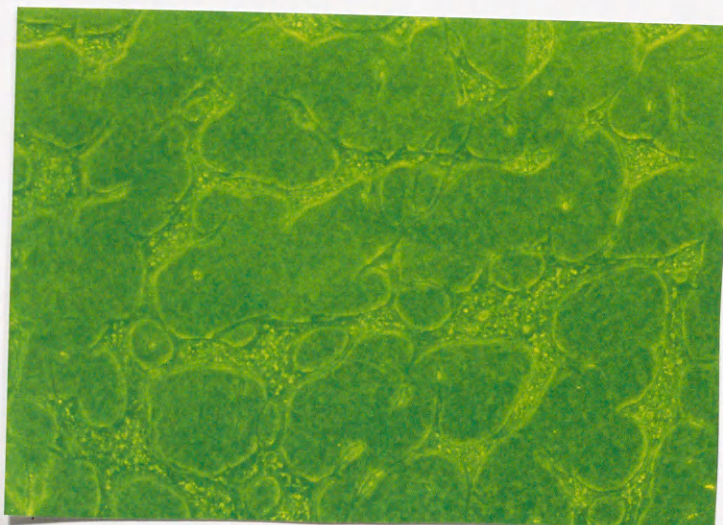




*Fig.3*

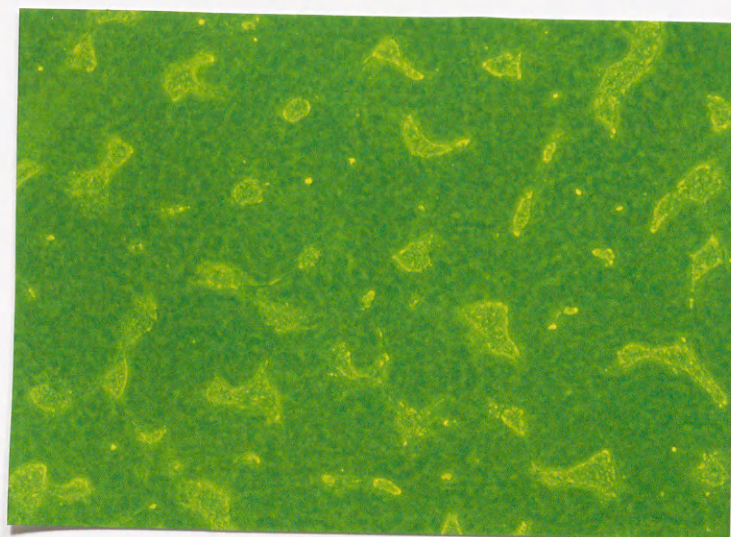
Effect of bovine aqueous humor  
on HUVEC's tube formation

1. Aqueous humor(-)



( $\times 40$ )

2. Aqueous humor(+)



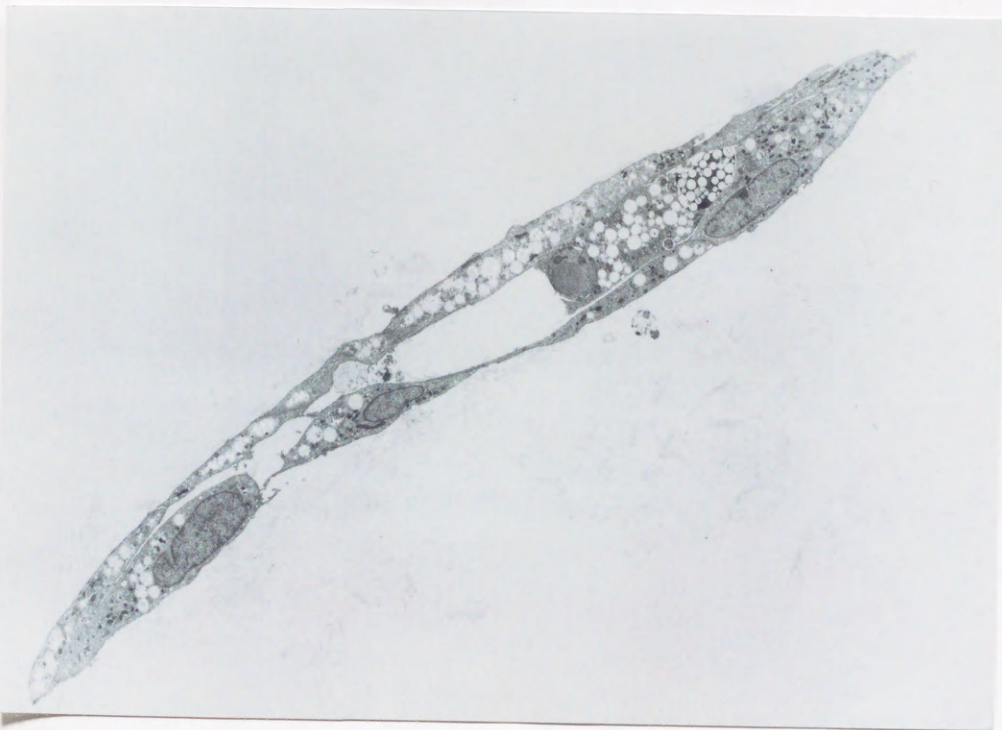
( $\times 40$ )

10  $\mu$  m



*Fig.4*

HUVEC's tube formation on the electric microscopy

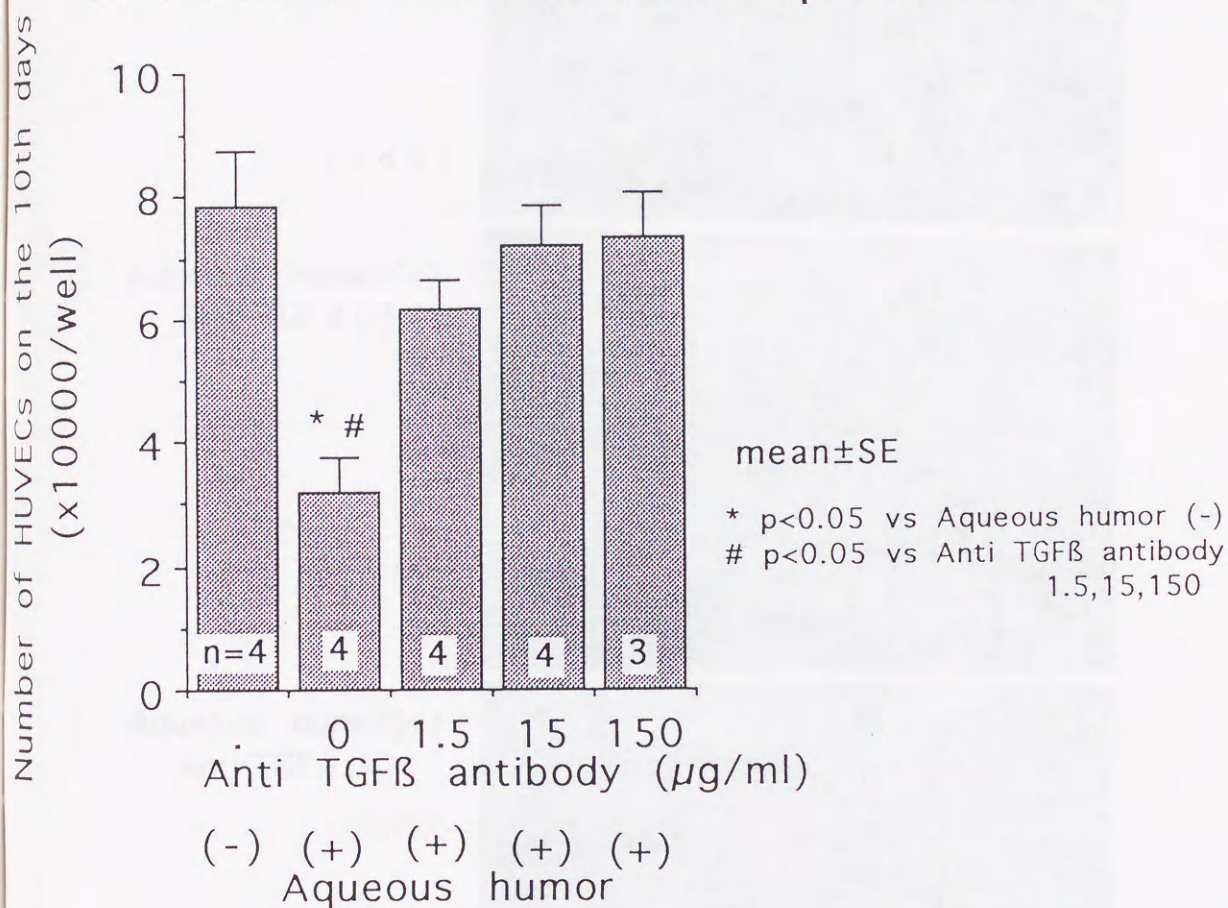


( x 2760 )



Fig. 5

Effect of anti-TGF $\beta$  antibody on growth of HUVECs cultured with aqueous humor



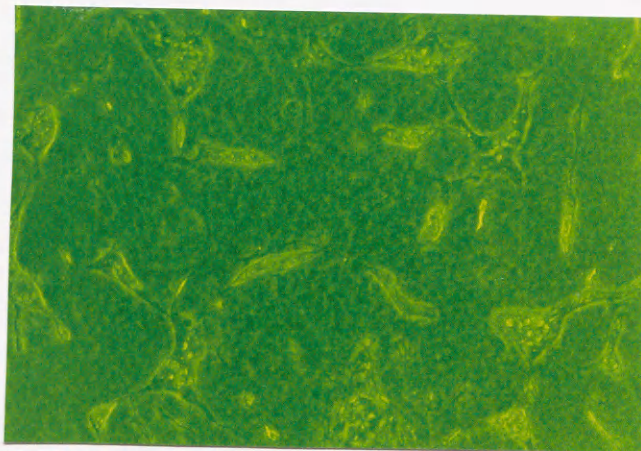


**Fig.6**

Effect of anti-TGF $\beta$  antibody on tube formation of HUVECs cultured with aqueous humor

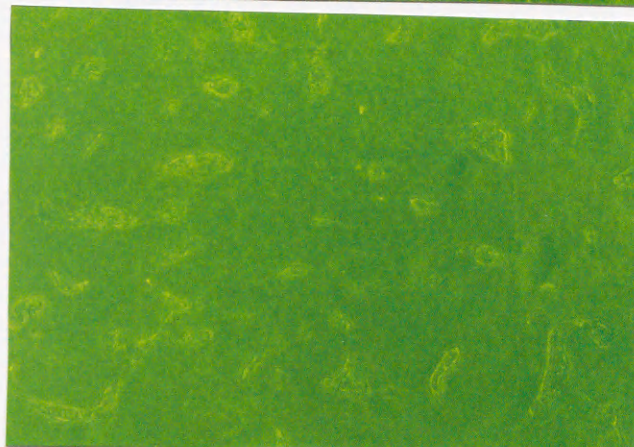
1. Aqueous humor(-)

( $\times 40$ )



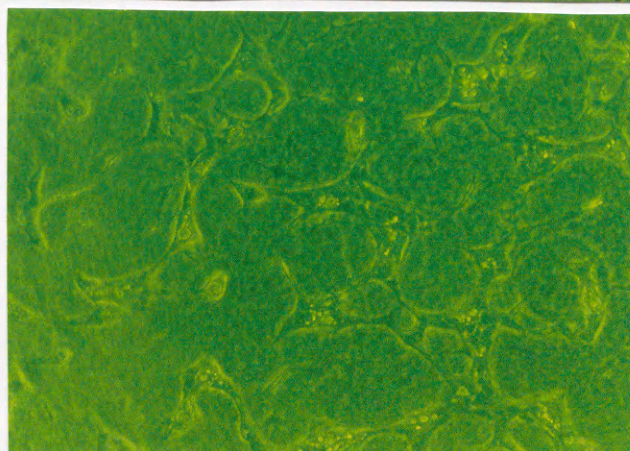
2. Aqueous humor(+)  
Anti-TGF $\beta$  (-)

( $\times 40$ )



3. Aqueous humor(+)  
Anti-TGF $\beta$  (+)

( $\times 40$ )



10  $\mu$ m



Fig. 7

Effect of fractionated aqueous humor  
on proliferation of HUVECs

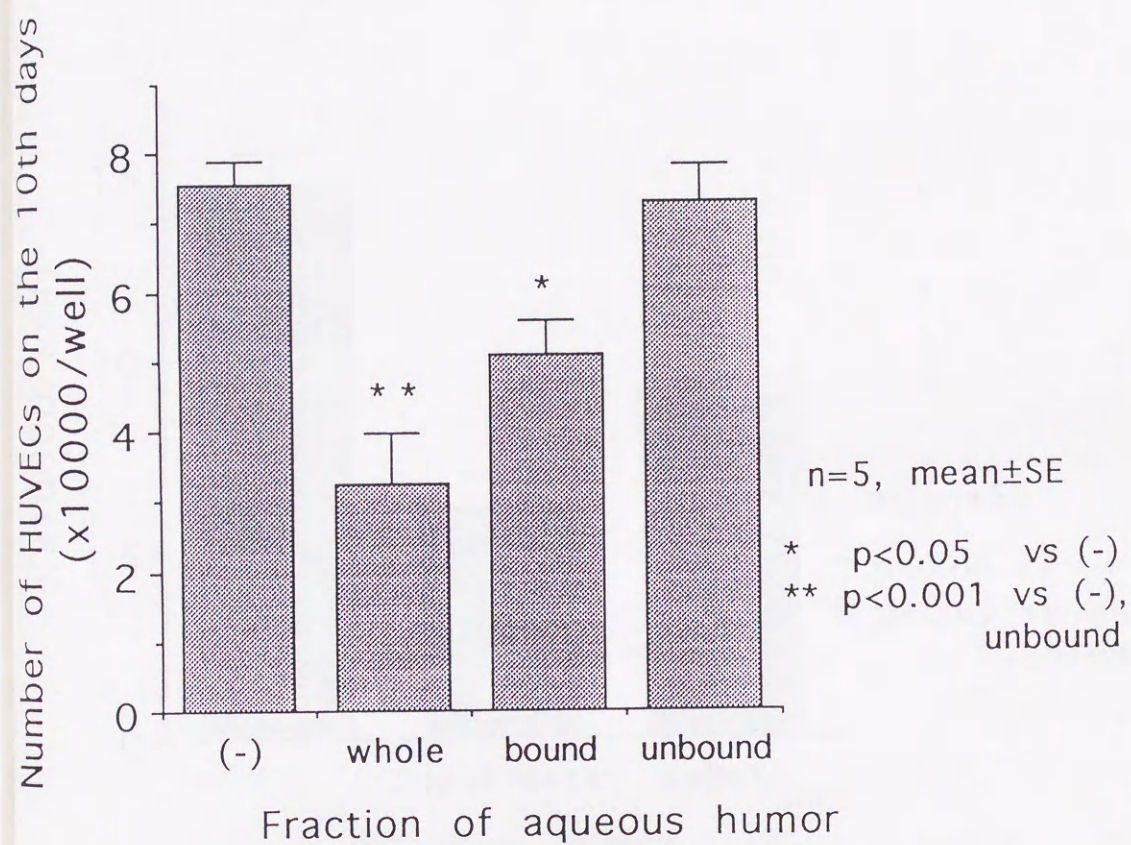


Fig.8

Effect of human diabetic aqueous humor  
on HUVEC's proliferation

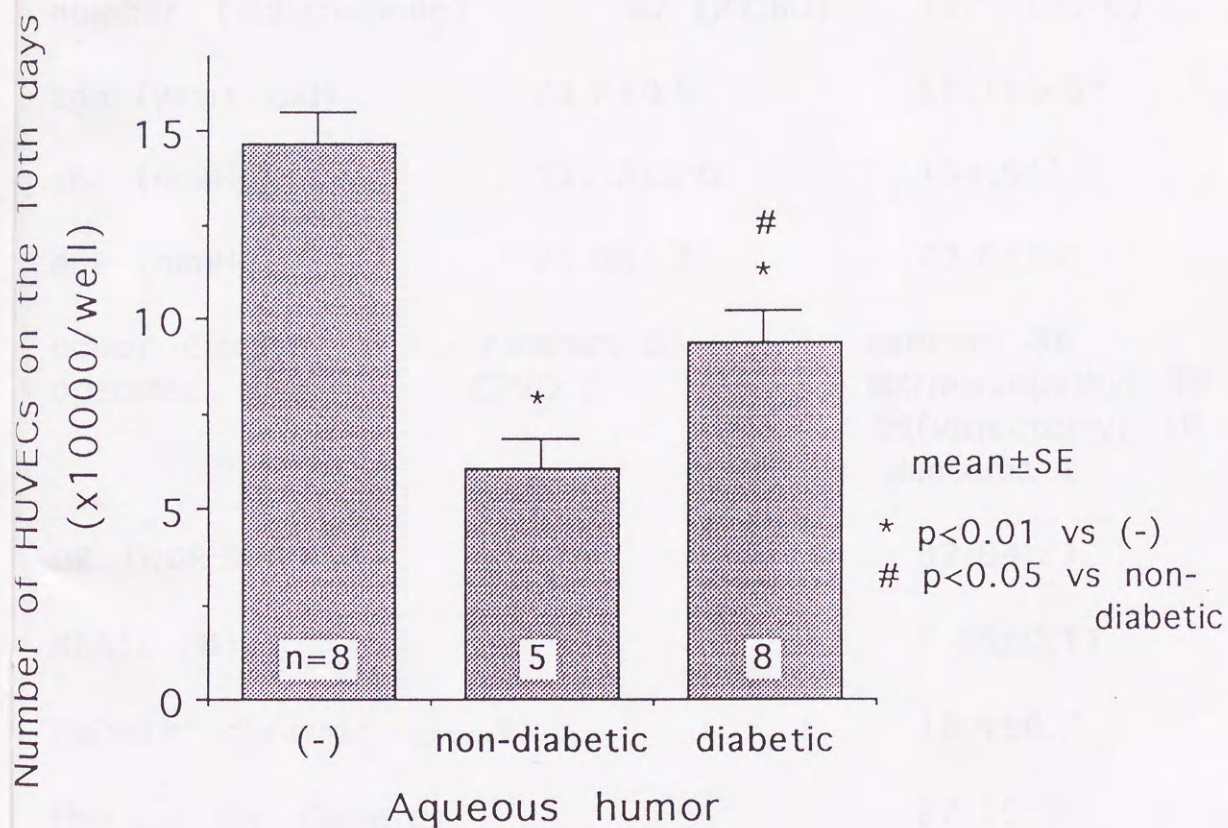




Table 1

Clinical background of patients operated  
on ocular surgery

	non-diabetic	diabetic
number (male:female)	87 (27:60)	137 (61:76)
age (years old)	74.2±0.9	65.1±0.9*
sBP (mmHg)	132.3±2.0	134.6±1.9
dBp (mmHg)	71.9±1.2	73.6±1.2
ocular disease operated for	cataract 85 CRVO 2	cataract 85 DR(macropathy) 38 DR(vitrectomy) 10 glaucoma 4
DR (NDR:SDR:PDR)		32:84:21
HbA1c (%)		7.36±0.11
diabetic duration (years)		10.4±0.7
therapy for diabetes (diet:OHA:insulin)		27:59:51

mean±SE

\*p&lt;0.005

*Table 2*

Effect of boiled aqueous humor on HUVEC's proliferation

Boiling of aqueous humor	Growth index (% of control)
(-)	64.4±4.4
(+)	63.7±9.4

n=4, mean±SE



*Table 3*

Effect of acidified aqueous humor on HUVEC's proliferation

Acidifying of aqueous humor	Growth index (% of control)
(-)	57.7±5.3
(+)	32.6±7.1*

n=4, mean±SE

\*P<0.05 vs (-)

*Table 4*

TGF  $\beta$  concentration in bovine aqueous humor

Fraction	TGF $\beta$ 1 (ng/ml)	TGF $\beta$ 2 (ng/ml)
whole sample	<0.1	5.68 $\pm$ 1.19 * ##
Heparin sepharose		
bound	<0.1	1.39 $\pm$ 0.38 #
unbound	<0.1	0.18 $\pm$ 0.18

n=4, mean  $\pm$  SE

\* p<0.05 vs bound fraction

# p<0.05 vs unbound fraction

## p<0.005 vs unbound fraction



*Table 5*

TGF  $\beta$  concentration in human aqueous humor

Character of aqueous humor	TGF $\beta$ 1 (ng/ml)	TGF $\beta$ 2 (ng/ml)
non-diabetic	<0.1 (n=17)	7 . 0 3 $\pm$ 0 . 7 5 ( 2 7 )
diabetic	<0.1 (17)	6.40 $\pm$ 0.72 (27)

mean $\pm$ SE

*Table 6*

The ratio of activated TGF  $\beta$  2 in human aqueous humor

Character of aqueous humor	The ratio of activated TGF $\beta$ 2 ( % )
non-diabetic	12.4 $\pm$ 1.20
diabetic	7.70 $\pm$ 1.20*

n=10, mean $\pm$ SE

\* p<0.05 vs non-diabetic



Table 6

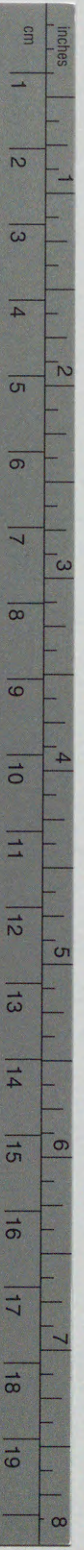
The ratio of activated TGF- $\beta$  in human aqueous humor

Character of aqueous humor	The ratio of activated TGF- $\beta$ (%)
non-diabetic	12.4 $\pm$ 1.5
diabetic	27.0 $\pm$ 1.20*

n=10, mean  $\pm$  SE

\* p<0.05 vs non-diabetic





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]
[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]	[Patch]

## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

- A
- 1 2 3 4 5 6
- M
- 8 9 10 11 12 13 14 15
- B
- 17 18 19

